

**Résumé de thèse**

pour le

**DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ BORDEAUX 2**

**Ecole doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé**

**Mention : Sciences, Technologie, Santé**

**Spécialité : Biochimie**

**Modélisation de la chaîne respiratoire et  
de la phosphorylation oxydative.**

**Titre anglais :**

**Modeling the respiratory chain and the  
oxidative phosphorylation**

rédigée par

**Par Margit HEISKE**

Ce travail a été réalisé dans le cadre d'un contrat de co-tutelle avec

**L'UNIVERSITÉ HUMBOLDT DE BERLIN**

## Résumé

Les mitochondries sont l'usine à énergie de la cellule chez les eucaryotes. Elles synthétisent l'ATP à partir d'une succession de réactions d'oxydo-réduction catalysées par quatre complexes respiratoires qui forment la chaîne respiratoire. Avec la machinerie de synthèse d'ATP l'ensemble constitue les oxydations phosphorylantes (OXPHOS). Le but de ce travail est de bâtir un modèle des OXPHOS basé sur des équations de vitesse simples mais thermodynamiquement correctes représentant l'activité des complexes de la chaîne respiratoire (équations de type Michaelis-Menten). Les paramètres cinétiques de ces équations sont identifiés en utilisant les cinétiques expérimentales de ces complexes respiratoires réalisées en absence de gradient de proton. La phase la plus délicate de ce travail a résidé dans l'introduction du gradient de protons dans ces équations. Nous avons trouvé que la meilleure manière était de distribuer l'effet du gradient de proton sous forme d'une loi exponentielle, découlant de la loi de Nernst, sur l'ensemble des paramètres,  $V_{\max}$  et  $K_m$  pour les substrats et les produits. De cette manière, j'ai montré qu'il était possible de représenter les variations d'oxygène, de  $\Delta\Psi$  et de  $\Delta pH$  expérimentalement observés dans la littérature. De plus, contrairement aux autres modèles, il fut possible de simuler les courbes de seuil observées expérimentalement lors de la titration du flux de respiration par l'inhibiteur d'un complexe respiratoire donné.

Ce modèle pourra présenter un très grand intérêt pour comprendre le rôle de mieux en mieux reconnu des mitochondries dans de nombreux processus cellulaires, tels que la production d'espèces réactives de l'oxygène, le vieillissement, le diabète, le cancer, les pathologies mitochondriales etc. comme l'illustrent un certain nombre de prédictions présentées dans ce travail.

Ce travail a été réalisé dans le cadre d'un contrat de co-tutelle entre l'université Humboldt de Berlin (Allemagne) et l'université Victor Segalen Bordeaux 2 (France) sous la codirection des professeurs Edda Klipp et Jean-Pierre Mazat.

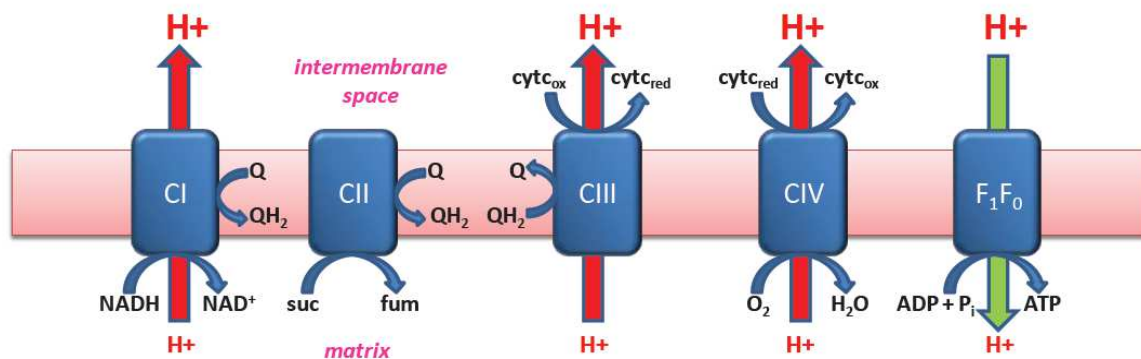
# Résumé du chapitre I : Introduction

## Contexte biologique

L'adénosine triphosphate (ATP) est une molécule centrale du métabolisme énergétique : elle est omniprésente dans la cellule où elle fournit de l'énergie pour de nombreux processus. Chez les eucaryotes, la production de cette molécule a lieu principalement dans les mitochondries, des organelles cellulaires qui possèdent deux membranes : la membrane externe délimite l'organelle du cytosol, la membrane interne, qui forme les crêtes, entoure la matrice mitochondriale. Entre ces membranes se trouve l'espace intermembranaire.

Cette structure est essentielle pour la production d'ATP par la voie métabolique nommée phosphorylation oxydative (OXPHOS). Cette dernière est réalisée par les quatre complexes enzymatiques constituant la chaîne respiratoire (complexes I à IV), dont la fonction est d'établir un gradient de protons à travers la membrane interne, et la  $F_1F_0$ -ATP synthase, qui utilise ce gradient comme force motrice pour la phosphorylation d'adénosine diphosphate (ADP) en ATP. Ce système enzymatique est schématisé sur la figure 1.

**Figure 1** : La phosphorylation oxydative : les complexes I – IV constituent la chaîne respiratoire dont la fonction est de créer un gradient de protons à travers la membrane interne, dû à l'énergie qui est libérée par la catalyse des réactions redox. Le gradient sert comme force motrice pour la phosphorylation d'ADP par la  $F_1F_0$ -ATP synthase.



L'énergie pour réaliser la translocation des protons de la matrice dans l'espace intermembranaire par les complexes I, III et IV est obtenue par une série de réactions redox : elles transfèrent à l'oxygène les électrons de l'adénine dinucléotide (NADH) et du succinate. Ces deux métabolites sont les produits de la dégradation des carbones par le cycle de Krebs, voie métabolique de la matrice mitochondriale.

Les complexes I et II sont les deux points d'entrées des électrons dans la chaîne respiratoire. Le complexe I réalise l'oxydation de NADH couplé à la réduction des quinones en quinols ; en parallèle le complexe II catalyse l'oxydation du succinate en fumarate pour réduire également les quinones mais ce complexe ne participe pas directement à l'établissement du gradient de protons. Le quinol est

ensuite réoxydé par le complexe III, cette réaction étant couplée à la réduction de deux cytochromes c. Au niveau du complexe IV, les électrons fournis par le cytochrome c sont finalement utilisés pour réduire l'oxygène en eau.

Les réactions des complexes des OXPHOS et leurs stœchiométries sont listées dans le **tableau 1**.

**Tableau 1.** Les réactions catalysées par les complexes OXPHOS. Pour le complexe III, la réaction nette est représentée.

|                |  |
|----------------|--|
| Complex I :    | $NADH + Q + 5 H_x^+ \leftrightarrow NAD^+ + QH_2 + 4 H_{is}^+$                   |
| Complex II :   | $Suc + Q \leftrightarrow Fum + QH_2$   |
| Complex III :  | $QH_2 + 2 cytc(ox) + 2 H_x^+ \leftrightarrow Q + 2 cytc(red) + 4 H_{is}^+$       |
| Complex IV:    | $2 cytc(red) + 1/2 O_2 + 4 H_x^+ \leftrightarrow 2 cytc(ox) + 2 H_{is}^+ + H_2O$ |
| ATP synthase : | $ADP + Pi + n_A H_{is}^+ \leftrightarrow ATP + (n_A - 1) H_x^+$                  |

Suc - succinate ; Fum – fumarate ; Q/QH<sub>2</sub> – quinone/quinol; cytc(ox)/cytc(red) – cytochrome c réduit/oxydé ; n<sub>A</sub> - nombre des protons utilisé pour la phosphorylation d'un ADP.

Les complexes OXPHOS fonctionnent selon des mécanismes très différents :

- Le complexe I est une pompe à protons, la réduction de quinone est couplée mécaniquement au transfert des protons. Il y a 8 centres redox entre les sites de liaison de NADH et des quinones.
- Dans le complexe II, les électrons du succinate sont transférés via 3 centres redox à une quinone.
- Le complexe III fonctionne selon le cycle des quinones : Il possède deux sites de liaison des quinones : le site Q<sub>o</sub> (coté espace intermembranaire) accepte les deux électrons du quinol (quinone réduite) et en donne un au cytochrome c et l'autre à une quinone située au site Q<sub>i</sub> (coté matriciel), qui va être réduite en semiquinone. L'oxydation d'un deuxième quinol au site Q<sub>o</sub> mène également à la réduction d'un cytochrome c, et à la réduction de la semiquinone en quinol. Comme la réduction d'une quinone (l'oxydation du quinol) est liée à la fixation (libération) de 2 protons, dans le cycle de Q deux protons sont pris dans la matrice (site Q<sub>i</sub>) et 4 sont libérés dans l'espace intramembranaire (site Q<sub>o</sub>).
- Le complexe IV est une pompe à protons. Ici les électrons sont transportés à l'intérieur via quatre centres redox. Le transfert des protons à partir de la matrice sont couplés à la réduction d'oxygène.
- L'ATP synthase peut être comparée à un moulin : les protons entrant par l'espace intermembranaire dans la structure de l'enzyme font tourner une partie du sous-complexe F<sub>0</sub> dans la membrane qui provoque un changement de conformation de la partie F<sub>1</sub> qui est située dans la matrice. Ce dernier permet d'assembler un ADP et un Pi en ATP par des forces mécaniques.

## Modélisation de la phosphorylation oxydative

En général, la modélisation aide à comprendre des systèmes complexes, et peut permettre de simuler un système sous des différentes conditions dont certaines peuvent être difficilement accessible par l'expérience ainsi qu'à tester des hypothèses, identifier des paramètres essentiels, chercher des conditions pour optimiser le système, planifier des expériences, etc. La modélisation est donc un outil puissant dont il faut cependant bien connaître les limites.

Bien que constituées seulement de 5 complexes enzymatiques, les OXPHOS sont un système complexe : Les complexes I, III et IV de la chaîne respiratoire n'établissent pas seulement le gradient de protons, mais leurs cinétiques et les équilibres des réactions redox qu'ils catalysent sont aussi influencés par ce gradient. Aussi la performance de l'ATP synthase et l'équilibre de la phosphorylation d'ADP sont-ils dépendants du gradient et ce dernier est consommé par la réaction. D'autre part, il ne suffit pas seulement d'examiner les complexes séparément, pour comprendre le fonctionnement des OXPHOS. D'autres composants doivent être rajoutés, comme la fuite des protons à travers la membrane interne, le recyclage de NADH (et succinate), les transports à travers des membranes, etc.

Dû à son rôle très central dans le métabolisme énergétique, il est d'une grande importance de bien connaître ce système. Un modèle des OXPHOS peut aider à bien comprendre son fonctionnement sous différentes conditions physiologiques : par exemple la composition relative des OXPHOS est différente entre différents tissus et espèces et peut varier aussi selon la demande énergétique dans la cellule. De plus les complexes peuvent s'assembler en supercomplexes dont les avantages cinétiques ne sont pas encore évidents. On sait aussi que les complexes I et III sont impliqués dans la production des dérivés réactifs d'oxygène qui est la base de l'hypothèse de l'implication de la mitochondrie dans le vieillissement.

Mais un modèle des OXPHOS peut aussi bien aider à mieux comprendre le rôle des OXPHOS dans des pathologies mitochondriales, mais aussi des maladies fréquentes comme les maladies de Parkinson et Huntington, le diabète, le cancer, qui ont été associées avec des changements du métabolisme mitochondrial.

Il y a un grand nombre de modèles qui ont été conçus pour décrire le système des OXPHOS dans différents contextes. Mais aucun de ces modèles ne correspond à notre but d'avoir un modèle dans lequel la cinétique de chaque complexe d'OXPHOS est aussi décrite individuellement et où en même temps ces cinétiques couvrent un large intervalle des concentrations des substrats et produits et également un large intervalle du gradient électrochimique.

Dans ce travail un tel modèle a été construit ; les chapitres correspondent aux étapes suivantes :

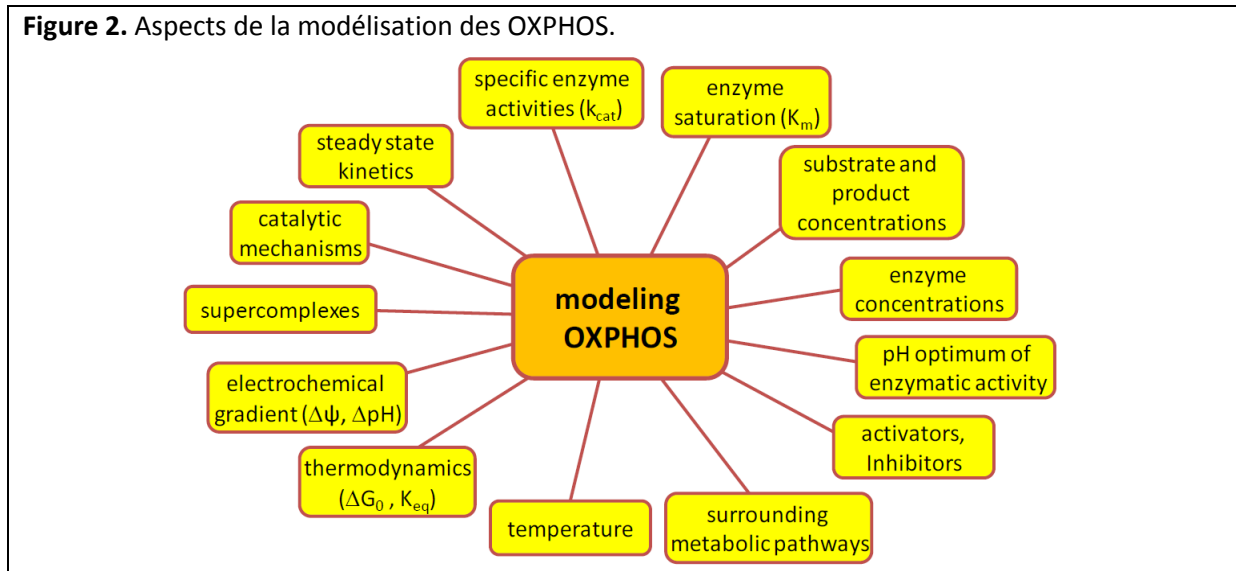
- 1) Représentation des cinétiques des complexes OXPHOS *en absence du gradient de protons* par des équations relativement simples mais qui sont valides pour des larges variations des concentrations des substrats et produits.

- 2) Introduction de *l'influence du gradient de protons* dans les équations d'une façon qui respecte les lois thermodynamiques et qui permet de décrire des activités physiologiques sur un large intervalle des valeurs du gradient électrochimique.
- 3) *Assemblage des équations* d'OXPHOS au sein d'un modèle 'cadre' qui contient déjà tous les composants nécessaires pour simuler les OXPHOS.

## Résumé du chapitre 2

Dans le chapitre 2 des équations relativement simples sont analysées pour décrire les cinétiques de complexes des OXPHOS, sur un large intervalle de concentrations des substrats et produits.

**Figure 2.** Aspects de la modélisation des OXPHOS.



La figure 2 montre une vue d'ensemble des aspects qui peuvent jouer un rôle dans la modélisation des OXPHOS. Dans ce contexte nous avons analysés les types d'équation suivants :

- « Thermodynamique proche d'équilibre » (NET). Ce type d'équation a été employé dans le modèle d'OXPHOS de Korzeniewski and Zoladz [2001]. Ici la vitesse de l'enzyme est proportionnelle à l'énergie de Gibbs de la réaction :

$$v = k \cdot \Delta G_R \quad \text{avec} \quad \Delta G_R = \Delta G_0 + RT \cdot \ln \left( \frac{\prod_j P_j^{\eta_j}}{\prod_i S_i^{\nu_i}} \right)$$

- « Loi d'action de masse » (MA). Ces cinétiques décrivant des réactions chimiques ont été employées dans le modèle de Korzeniewski et Zoladz [2001] pour le complexe IV et dans le modèle de Beard [2005] pour tous les complexes des OXPHOS, avec quelques modifications :

$$v = k_f \cdot \prod_i S_i^{\nu_i} - k_b \cdot \prod_j P_j^{\eta_j}$$

- Les équations du type « Michaelis-Menten » (MM) sont classiquement appliquées pour décrire les cinétiques d'enzymes [Segel 1993]. Elles représentent le comportement de la saturation par des substrats et des produits, exprimé en vitesses maximales ( $V_{\max}$ ) et des constantes Michaelis-Menten ( $K_M$ ). Dans ce travail le mécanisme ordonné (OM) et ping pong (PPM) ainsi que le mécanisme de fixation au hasard (RB pour « Random Binding ») ont été considérés, tous en forme normal et simplifiés. Selon le mécanisme, les équations du type MM sont restreintes à un certain nombre de substrats et produits. Nous avons également considéré l'équation « Convenience Kinetics » (CK). Elle n'est généralement pas restreinte

sur le nombre de substrats et produits. Une équation du type Michaelis-Menten est de la forme

$$v = \frac{V_{\max f} \cdot \prod_i \left( \frac{S_i}{K_{S_i}} \right)^{v_i} - V_{\max b} \cdot \prod_j \left( \frac{P_j}{K_{P_j}} \right)^{\eta_j}}{f \left( \frac{S_i}{K_{S_i}} (i = 1 \dots m), \frac{P_j}{K_{P_j}} (j = 1 \dots n) \right)}$$

- J'ai, de plus, proposé l'équation « loi d'action de masse modifiée » (EMA) de complexité intermédiaire par rapport aux équations présentées ci-dessus. Cette équation est basée sur un mécanisme de liaison simultanée des substrats à l'enzyme avec une étape limitant qui est le changement de la conformation de l'enzyme. Cette équation est très flexible car elle peut être utilisée, comme MAL et NET pour toutes stœchiométries et nombre de substrats et produits et elle montre de plus le comportement de saturation.

$$v = \frac{V_{\max f} \cdot \prod_i \frac{S_i^{v_i}}{C_S} - V_{\max b} \cdot \frac{\prod_j P_j^{\eta_j}}{C_P}}{1 + \frac{\prod_i S_i^{v_i}}{C_S} + \frac{\prod_j P_j^{\eta_j}}{C_P}}$$

Nous avons analysées ces types d'équations par rapport à leur aptitude à décrire les données expérimentales de chaque complexe respiratoire. Nous avons effectué ces expériences en utilisant des mitochondries du cœur de bœuf, qui ont été fourni par le groupe de Dr. Joel Lunardi (Grenoble).

Les expériences ont été conduites de deux manières :

- 1) Mesure des vitesses initiales (quasi stationnaire) en fonction des concentrations de substrats et produits
- 2) Mesures au cours de temps des concentrations (disparition d'un substrat ou apparition d'un produit).

### Mesures des concentrations cours de temps

Une mesure au cours de temps permet de couvrir un large ensemble de concentrations de substrats et produits. On peut aussi calculer une vitesse à ces différentes concentrations en prenant la dérivée en chaque point. Nous avons cependant trouvé que cette méthode est moins appropriée pour l'analyse des équations et la détermination de leurs paramètres pour les raisons suivantes :

- *Complexe I* : les mesures des cinétiques des enzymes sont associées avec des réactions parasites qui apparaissent en rajoutant des quinones (réfraction, intégration des quinones en micelles et dans les membranes mitochondriales) ainsi qu'à une réoxydation de quinone réduite, qui est probablement spontanée. Il est difficile de soustraire ces effets des courbes de cours de temps.



- *Complexe II* : Pour visualiser l'activité de ce complexe une réaction chimique supplémentaire est nécessaire (accepteur d'électrons final : DCIP). Deux réactions seraient donc superposées ce qui rendrait difficile l'analyse des courbes en fonction du temps.
- *Complexe III* : Une réaction directe des substrats (non catalysés par l'enzyme) à lieu, ce qui est difficile à corriger pour les données en fonction du temps
- *Complexe IV* : Les conditions expérimentales que nous avons choisies ne permettent pas de suivre la concentration d'oxygène ni de la maintenir constante.
- Seulement pour estimer l'influence des produits sur l'activité du complexe II, des données au cours du temps ont été utilisées. Nous avons établi un nouvel protocole pour ce cas, où la catalyse enzymatique a lieu en absence de DCIP. En fonction du temps, des petits volumes sont prélevés du mélange réactif et servent à analyser des concentrations actuelles via la réaction avec le DCIP. Nous avons testés différentes méthodes de calcul pour estimer la concentration de QH<sub>2</sub> dans la solution analytique à partir de la réaction avec le DCIP, et nous avons ainsi trouvé que les résultats les plus fiables sont obtenus en fittant les courbes au cours du temps, obtenues par l'oxydation « analytique » de QH<sub>2</sub> via le DCIP.

A l'exception de ce cas, nous avons analysé les équations et déterminé leurs paramètres pour chaque complexe respiratoire en utilisant les données des vitesses initiales.

### **Vitesses initiales**

J'ai montré que les équations MAL et NET n'étaient pas appropriées pour la description des vitesses initiales sur un large intervalle de concentrations des substrats et produits. Avec EMA les résultats étaient souvent acceptables, mais dans quelques particuliers (par exemple en présence d'un produit mais en absence de l'autre produit) la déviation était trop importante.

Nous avons montré qu'avec les équations du type MM les vitesses initiales se laissent généralement très bien reproduire. Dans quelques cas seulement les déviations étaient un peu augmentées mais restaient toujours bien acceptables.

Pour les différentes équations du type MM nous avons trouvé des adéquations très similaires ; il y avait cependant de grandes différences concernant les  $K_m$  des produits, jusqu'à quelques ordres de grandeur. Ceci est dû au fait que les réactions des complexes de la chaîne respiratoire sont irréversibles en absence du gradient de protons (sauf la réaction du complexe II), et l'influence des produits peut seulement être estimée par la réaction 'aller'. Les équations RB et CK montrent des  $K_m$  des produits raisonnables, alors que les  $K_m$  de OM et CK étaient très augmentés ou bien, respectivement, réduits.

Les résultats pour RB sont montrés dans tableau 2. Nous avons choisi cette équation car elle est applicable à tous les complexes, alors que PPM ne l'est pas. La plupart des valeurs des paramètres sont en accord avec les valeurs de la littérature. Une exception est le  $K_{suc}$  que nous avons trouvé plus élevé, et pour les quinones il est à remarqué que dans la littérature différentes analogues de quinones sont employés dans l'enzymologie ce qui mène à des valeurs différentes des  $K_m$ ; nous avons utilisé la decylubiquinone.

**Table 2.** Comparaison des paramètres cinétiques des complexes respiratoires. Les paramètres listés ci-dessous ont été tous estimés pour l'équation RB. Les activités de complexes sont rapportées au transport de deux électrons. Pour le complexe III, deux possibilités sont donnés : a) l'équation prends en compte les deux sites de liaison de Q ( $Q_o$  et  $Q_i$ ) avec une réaction de premier ordre pour le cytochrome c ; b) l'équation décrit la réaction nette du complexe III, avec une réaction d'ordre 2 pour le cytochrome c. Pour le complexe II, nous n'avons pas pu déterminer le  $K_{fum}$ , et en conséquence nous avons pris la même valeur que  $K_{suc}$ . Les  $K_m$  en lettres grasses marquent les  $K_m$  des substrats des réactions.

| Complex | $K_{cat}^+$<br>[nmol/min/mg] | $K_{NADH}$<br>[ $\mu$ M] | $K_{NAD}$<br>[ $\mu$ M] | $K_{suc}$<br>[ $\mu$ M] | $K_{fum}$<br>[ $\mu$ M] | $K_{QH2}$<br>[ $\mu$ M] | $K_Q$<br>[ $\mu$ M] | $K_{Cred}$<br>[ $\mu$ M] | $K_{Cox}$<br>[ $\mu$ M] |
|---------|------------------------------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|---------------------|--------------------------|-------------------------|
| I       | 3582                         | <b>4.3</b>               | 780                     | <b>18796</b>            | (18796)                 | 5.3                     | <b>9.7</b>          | 352                      | <b>21.8</b>             |
| II      | 1704                         |                          |                         |                         |                         | 1.8                     | <b>2.5</b>          |                          |                         |
| III (a) | 11452                        |                          |                         |                         |                         | <b>188 (o)</b>          | 276 (o)             |                          |                         |
| III (b) | 8090                         |                          |                         |                         |                         | 6.7 (i)                 | <b>0.01 (i)</b>     |                          |                         |
| IV      | 13783                        |                          |                         |                         |                         | <b>138</b>              | 323                 | 312                      | <b>7.7</b>              |
|         |                              |                          |                         |                         |                         |                         |                     | <b>65.0</b>              | 56.3                    |

A la fin du chapitre 2 nous discutons la valeur des activités le long de la chaîne respiratoire par rapport aux données de la littérature sur la taille et les états redox des pools de quinone et de cytochrome c, et l'importance des valeurs des  $K_m$  sur le contrôle de l'activité de la chaîne respiratoire.

Pour le complexe I nous avons observé une inhibition aux fortes concentrations du substrat quinone. Nous supposons que cette inhibition est liée à la situation particulière du site de réduction de quinone : comme il est en dehors du niveau membranaire et se trouve ainsi dans un environnement hydrophile, il est probable que les quinones et quinols, étant hydrophobes, doivent emprunter un chemin lipophile qui les guide. Une concentration forte de quinone pourrait donc bloquer ce chemin et empêcher un quinol de partir du site, ainsi que les quinols pourraient inhiber les quinones d'entrer au site. Nous avons modélisé ceci par une expression d'inhibition qui a été rajoutée à l'équation cinétique (RB) et qui a pu améliorer la reproduction des données expérimentales à fortes concentrations de quinone. Différentes expressions d'inhibition, ont été analysées, parmi lesquelles l'inhibition stérique avec une constant d'inhibition identique pour quinone et quinol donnait les meilleurs résultats.

Bien que le complexe III montre un fonctionnement assez complexe grâce à ses deux sites quinone qui sont la base du cycle de Q, il se laisse bien décrire par une équation qui prend en compte seulement la réaction nette. Des résultats légèrement améliorés sont obtenus si l'on prend en compte les deux sites Q, ce qui implique aussi de déterminer un  $K_Q$  et  $K_{QH2}$  pour chaque site. Le nombre des paramètres augmente ainsi et mène à une sous-détermination des paramètres. Aussi l'application d'une expression d'inhibition par quinone ou quinol peut améliorer la précision mais entraîne également des incertitudes sur les paramètres.

Comme les cinétiques des complexes de la chaîne respiratoire peuvent être bien décrites par l'équation RB malgré des mécanismes intrinsèquement si différentes, nous supposons également que la cinétique de l'ATP-synthase peut-être bien reproduite par ce type d'équation.

### **Modèle stochastique de complexe I.**

Nous avons analysés les cinétiques du complexe I également avec le modèle stochastique de Ransac et al. [2010, 2012]. Ce modèle prend en comptes tous les passages des électrons entre les centres redox du complexe I. Nous avons ajustés les paramètres du modèles de telle sorte que les données expérimentales des vitesses initiales soient bien reproduites dans les simulations. Le modèle stochastique décrit mieux ces donnés que les équations du type MM. En particulier nous avons pu montrer que le mécanisme cinétique ne correspond à aucun de mécanisme classique : les centres redox dans le complexe I servent à un réservoir d'électrons qui peut rendre indépendant l'oxydation de NADH de la réduction de quinone, ce qui est manifesté par un plateau de vitesse qu'on observe quand on varie la concentration de NADH à une concentration fixe de quinone. Ce comportement ne correspond pas à des mécanismes classiques, où la vitesse tend asymptotiquement vers son maximum. Pour de faibles concentrations fixes de NADH, on obtient aussi un plateau en variant la concentration de quinone, mais cet effet se perd en augmentant NADH, ce qui montre que l'oxydation de NADH a lieu plus vite que la réduction de quinone.

Pour le modèle stochastique nous avons également modélisé une inhibition de l'activité de ce complexe par quinone et quinol. Pour ceci, nous avons introduit un deuxième site Q , par lequel les quinones et les quinols doivent passer en accédant au site de réduction de Q ou bien en partant de ce site, avec la contrainte que le nouveau site Q ne puisse accepter qu'une seule molécule. Si ce site est occupé, les autres molécules ne peuvent pas passer. Un tel site n'existe probablement pas en tant que tel, mais il est un moyen de symboliser le passage des quinones/quinols de la membrane au site de réduction et vice versa. Cette modification a mené à une meilleure description des activités aux fortes concentrations de quinone.

## Résumé du chapitre 3

En conditions physiologiques la chaîne respiratoire établit un gradient de proton à travers la membrane interne dont la force change selon l'état énergétique. Ceci décale non seulement l'équilibre des réactions des complexes OXPHOS mais aussi leurs activités.

Dans ce chapitre nous proposons une façon d'intégrer cette influence thermodynamique et cinétique dans les équations cinétiques de type Michaelis-Menten.

Premièrement, les bases thermodynamiques sont présentées et en particulier le fait que des changements thermodynamiques, c'est-à-dire le changement du gradient électrochimique, ne renseigne pas sur les valeurs absolues des activités des enzymes.

Nous discutons également le fait qu'en principe le composant électrique ( $\Delta\psi$ ) du gradient devrait agir différemment sur les cinétiques que le composant chimique ( $\Delta pH$ ). Pour éviter une trop grande complexité du modèle, nous avons décidé de traiter de la même manière ces deux composants.

Nous supposons, qu'à chaque valeur du gradient,  $\Delta\mu_H$ , les complexes OXPHOS suivent une cinétique de type Michaelis-Menten. Ceci implique que les constantes cinétiques, les  $K_m$  et les  $V_{max}$ , peuvent en principe être dépendants de  $\Delta\mu_H$ . Nous avons analysé des différentes manières de répartir l'influence de  $\Delta\mu_H$  sur ces constantes.

Pour ceci nous avons défini pour chaque complexe OXPHOS, l'énergie  $\Delta G_H$  dont il a besoin pour réaliser la translocation des protons et des électrons lié à un turnover enzymatique. Puis nous avons introduit des constantes qui règlent la distribution de  $\Delta G_H$  parmi les constantes cinétiques : les constantes «  $\zeta$  » définissent la répartition entre des couples de paramètres, c'est-à-dire des  $K_m$  d'un substrat et son produit (par exemple  $K_{NADH}$  et  $K_{NAD}$ ) ou bien du couple des vitesses maximales ( $V_{maxf}$  et  $V_{maxb}$ ). Nous supposons que la plupart de  $\Delta G_H$  jouent sur les  $V_{max}$ , car ces constantes traduisent les processus à l'intérieur des enzymes.

Puis les constantes  $\gamma$  règlent la distribution entre les partenaires d'un couple ; pour les  $K_m$  les «  $\gamma$  » sont mis pour toutes les simulations à 0.5 ce qui correspond à une répartition égale entre les deux partenaires du couple.

Dans une première analyse nous avons aussi mis le  $\gamma_V$  ( $\gamma$  des  $V_{max}$ ) à 0.5, c'est-à-dire les vitesses maximales en sens aller et retour sont influencé par le gradient électrochimique de la même façon. Dans ce cas, on obtient seulement des activités suffisantes aux  $\Delta\Psi$  physiologique (environ 150 – 200 mV) si le gradient joue presque entièrement sur les constantes Michaelis-Menten et pratiquement pas sur les  $V_{max}$ . La répartition est thermodynamiquement correcte mais ne correspond pas à l'idée que ce sont les processus internes de l'enzyme, qui sont le plus couplés au transfert des protons. En outre, les  $K_m$  changeraient extrêmement en fonction du gradient ce qui n'est pas probable non plus.

Une deuxième approche était de varier la proportion de répartition entre les deux  $V_{max}$ . En choisissant le  $\gamma$  de telle sorte que le  $V_{maxf}$  soit moins influencé par le gradient que le  $V_{maxb}$ , il est possible d'avoir des vitesses correctes aux  $\Delta\Psi$  physiologique sans trop changer la valeur des  $K_m$ . Cependant cette approche a le grand désavantage que dans des conditions qui peuvent reverser l'activité des enzymes nous trouvons des activités qui montent rapidement à des valeurs extrêmes et

non physiologiques. Ceci concerne en particulier le complexe I et l'ATP-synthase ; ces deux complexes sont réversibles.

Nous avons donc développé une approche qui permet d'avoir des activités correctes pour les vitesses de fonctionnement aller et retour, tout en respectant les lois thermodynamiques.

Pour cela nous avons défini l'énergie interne  $\Delta G_{\text{int}}$  des complexes OXPHOS. Elle représente toute l'énergie de la catalyse qui n'est pas liée à la liaison et la libération des substrats et produits ; ces dernières sont représentées approximativement par les  $K_m$ . L'énergie interne inclut donc aussi la partie du gradient qui joue sur les  $V_{\text{max}}$  :

$$\Delta G_{\text{int}}^0 = -RT \cdot \ln \left( \frac{V_{\text{max}}^+}{V_{\text{max}}^-} \right) + \zeta_V \cdot \Delta G_H = \Delta G_0 + RT \cdot \ln \left( \frac{\prod_n K_{P_n}^{\eta_n}}{\prod_m K_{S_m}^{\nu_m}} \right) + \zeta_V \cdot \Delta G_H$$

Nous exprimons les vitesses maximales en fonction de  $\gamma_V$  et  $\Delta G_{\text{int}}$  :

$$V_{\text{max}}^+(\Delta G_{\text{int}}) = k \cdot \exp \left( \gamma_V(\Delta G_{\text{int}}) \cdot \left( -\frac{\zeta_V \cdot \Delta G_{\text{int}}}{RT} \right) \right)$$

$$V_{\text{max}}^-(\Delta G_{\text{int}}) = k \cdot \exp \left( (\gamma_V(\Delta G_{\text{int}}) - 1) \cdot \left( -\frac{\zeta_V \cdot \Delta G_{\text{int}}}{RT} \right) \right)$$

Nous avons rendu dépendants les  $\gamma_V$  des  $\Delta G_{\text{int}}$ . Nous distribuons maintenant l'influence du gradient sur les constantes de vitesses de la manière suivante :

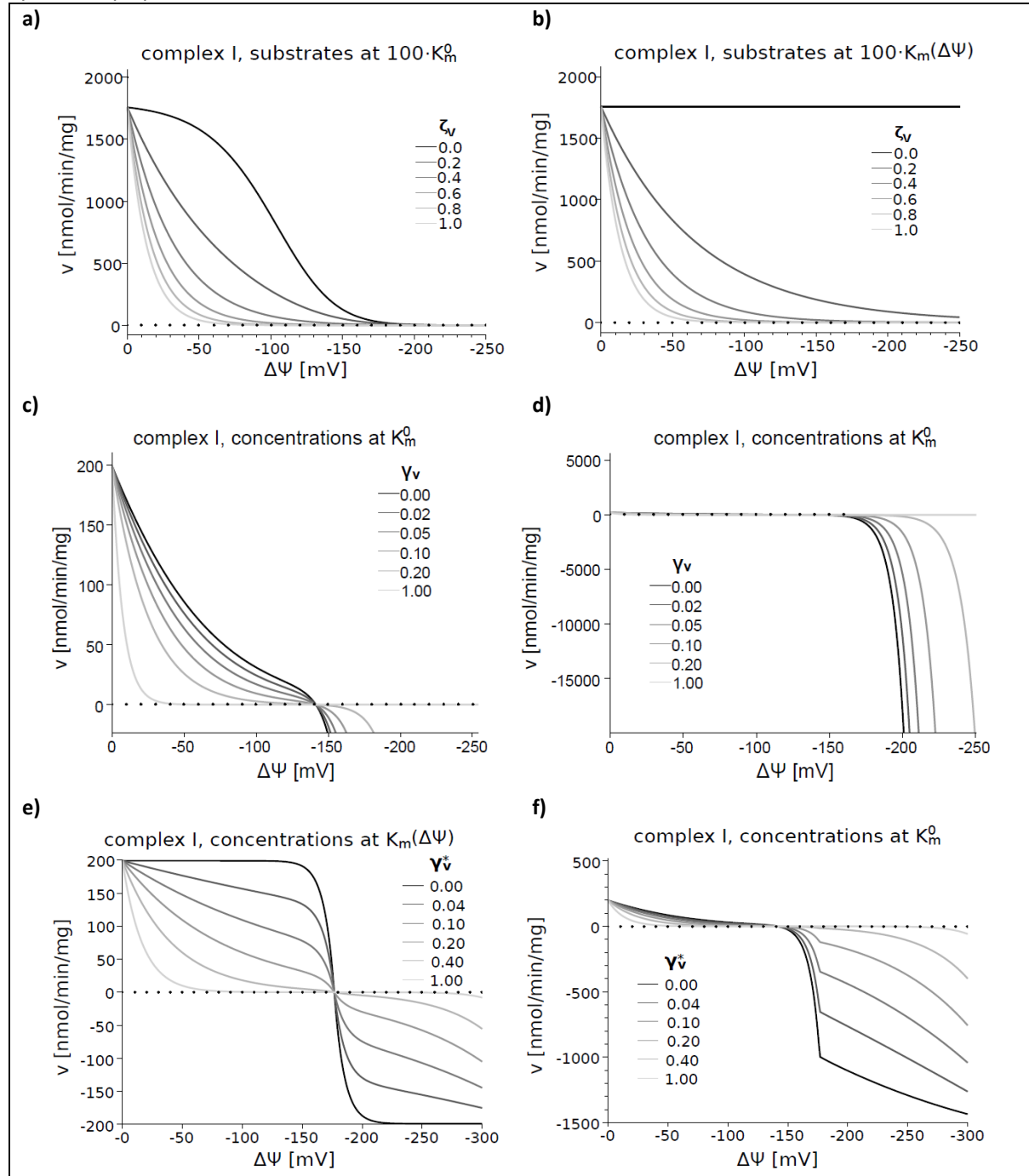
$$\gamma_V(\Delta G_{\text{int}}) = \begin{cases} \gamma_V^* & \text{si } \Delta G_{\text{int}} < 0, \\ 0.5 & \text{si } \Delta G_{\text{int}} = 0, \\ 1 - \gamma_V^* & \text{si } \Delta G_{\text{int}} > 0. \end{cases}$$

Cette fonction fait changer abruptement la valeur de  $\gamma_V$  mais nous avons trouvé qu'un changement plus doux peut créer des allures non physiologiques des courbes qui représentent l'activité d'une enzyme en fonction de  $\Delta G_{\text{int}}$ .

Avec cette nouvelle approche nous avons obtenu une expression cinétique qui garanti des activités des complexes OXPHOS physiologiquement raisonnables sur un très large intervalle du gradient de protons. Egalement cette nouvelle expression prend aussi bien en compte les cinétiques sur un large intervalle des concentrations des substrats et produits. Une équation cinétique qui réuni ces deux qualités est nouvelle pour la modélisation des OXPHOS

Les nouvelles équations sont listées dans le tableau 3, le comportement de l'activité en fonction du gradient est montré dans la figure 3 dans le cas du complexe I.

**Figure 3 :** Activité des complexes OXPHOS en fonction du gradient électrique  $\Delta\Psi$  (à  $\Delta pH = 0$ ) avec l'exemple de complexe I. a) et b) la partie du gradient qui joue sur les  $V_{\max f}$  et  $V_{\max b}$  est distribuée également sur ces deux constantes ( $\gamma_V = 0.5$ ). Seulement si la plupart du gradient est portée par les  $K_m$  ( $\zeta_V$  proche de 0), les activités peuvent atteindre des valeurs raisonnables au gradient physiologique (-150 ... -200 mV). c) et d) la distribution sur les  $V_{\max}$  est non symétrique ( $\gamma_V \neq 0.5$ ). Déjà à des faibles concentrations des substrats (à leur  $K_{m0}$ , c'est-à-dire le  $K_m$  en absence du gradient), des activités raisonnables peuvent être atteinte proche de -150 mV bien que la plupart du gradient joue sur les  $V_{\max}$  (ici  $\zeta_V = 0.8$ ). Cependant, si le  $\Delta\Psi$  devient assez négatif pour inverser la réaction, on observe que les activités tendent rapidement vers des valeurs extrêmes non physiologiques. e) et f). Avec la nouvelle approche nous obtenons des activités correctes dans les deux sens de la réaction. Cette qualité est en particulier importante pour la modélisation du complexe I et pour l'ATP-synthase qui peuvent fonctionner en sens inverse.



**Tableau 3:** Les nouvelles équations cinétiques pour les complexes des OXPHOS. Pour le complexe III, on a considéré la réaction nette. Dans la thèse nous montrons aussi des équations qui prennent en compte les deux sites différents de la liaison des quinones (base du cycle de Q).

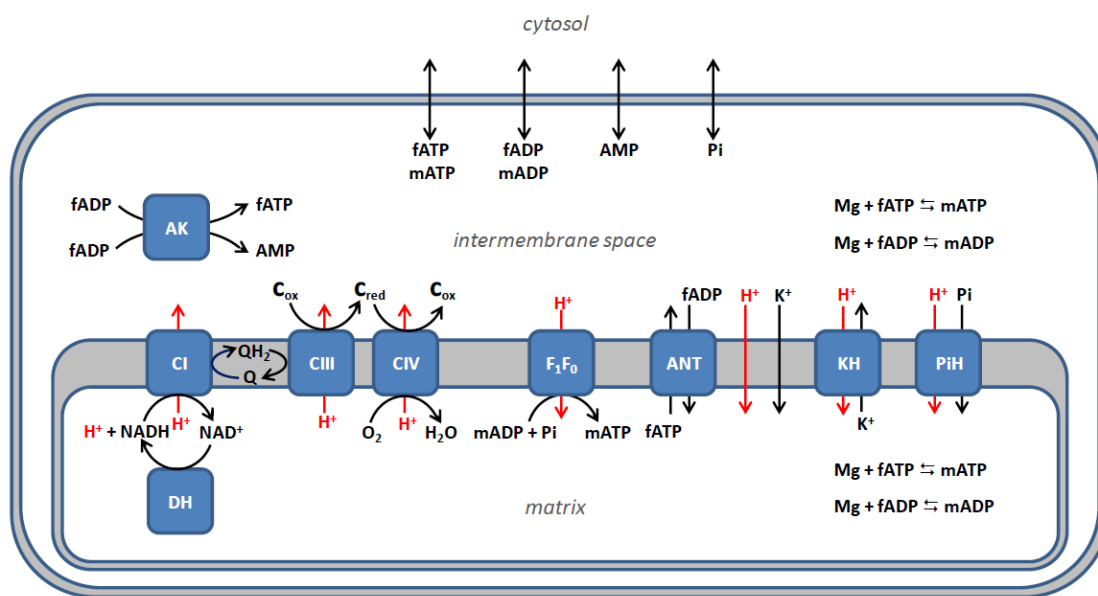
|  |  |
|--|--|
| <p><b>Complex I</b></p> $n_o = \frac{[NAD]}{K_{NAD}} \cdot \exp\left((\gamma_N - 1) \cdot \zeta_N \cdot \left(-\frac{\Delta G_H^{C1}}{RT}\right)\right)$ $q_o = \frac{[Q]}{K_Q} \cdot \exp\left(\gamma_Q \cdot \zeta_Q \cdot \left(-\frac{\Delta G_H^{C1}}{RT}\right)\right)$  | $v_{C1} = \frac{V_{\max}^+ \cdot n_r \cdot q_o - V_{\max}^- \cdot n_o \cdot q_r}{(1 + n_o + n_r) \cdot (1 + q_o + q_r)}$ $n_r = \frac{[NADH]}{K_{NADH}} \cdot \exp\left(\gamma_N \cdot \zeta_N \cdot \left(-\frac{\Delta G_H^{C1}}{RT}\right)\right)$ $q_r = \frac{[QH_2]}{K_{QH_2}} \cdot \exp\left((\gamma_Q - 1) \cdot \zeta_Q \cdot \left(-\frac{\Delta G_H^{C1}}{RT}\right)\right)$                             |
| <p><b>Complex III</b></p> $c_o = \frac{[cytc_{ox}]}{K_{cytc_{ox}}} \cdot \exp\left(\gamma_c \cdot \frac{\zeta_c}{2} \cdot \left(-\frac{\Delta G_H^{C3}}{RT}\right)\right)$ $q_o = \frac{[Q]}{K_Q} \cdot \exp\left((\gamma_Q - 1) \cdot \zeta_Q \cdot \left(-\frac{\Delta G_H^{C3}}{RT}\right)\right)$                          | $v_{C3} = \frac{V_{\max}^+ \cdot q_r \cdot c_o^2 - V_{\max}^- \cdot q_o \cdot c_r^2}{(1 + q_o + q_r) \cdot (1 + c_o + c_r)^2}$ $c_r = \frac{[cytc_{red}]}{K_{cytc_{red}}} \cdot \exp\left((\gamma_c - 1) \cdot \frac{\zeta_c}{2} \cdot \left(-\frac{\Delta G_H^{C3}}{RT}\right)\right)$ $q_r = \frac{[QH_2]}{K_{QH_2}} \cdot \exp\left(\gamma_Q \cdot \zeta_Q \cdot \left(-\frac{\Delta G_H^{C3}}{RT}\right)\right)$ |
| <p><b>Complex IV</b></p> $c_o = \frac{[cytc_{ox}]}{K_{cytc_{ox}}} \cdot \exp\left((\gamma_c - 1) \cdot \zeta_c \cdot \left(-\frac{\Delta G_H^{C4}}{RT}\right)\right)$ $o_2 = \frac{[O_2]}{K_{O_2}} \cdot \exp\left(\frac{\zeta_{o_2}}{0.25} \cdot \left(-\frac{\Delta G_H^{C4}}{RT}\right)\right)$                             | $v_{C4} = \frac{V_{\max}^+ \cdot c_r \cdot o_2^{0.25} - V_{\max}^- \cdot c_o}{(1 + c_o + c_r) \cdot (1 + o_2)^{0.25}}$ $c_r = \frac{[cytc_{red}]}{K_{cytc_{red}}} \cdot \exp\left(\gamma_c \cdot \zeta_c \cdot \left(-\frac{\Delta G_H^{C4}}{RT}\right)\right)$  |
| <p><b>F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP-synthase</b></p> $atp = \frac{[ATP]}{K_{ATP}} \cdot \exp\left(\gamma_A \cdot \zeta_A \cdot \left(-\frac{\Delta G_H^{F1}}{RT}\right)\right)$ $pi = \frac{[Pi]}{K_{Pi}} \cdot \exp\left(-\zeta_P \cdot \left(-\frac{\Delta G_H^{F1}}{RT}\right)\right)$                                     | $v_{F1} = -\frac{V_{\max}^+ \cdot atp - V_{\max}^- \cdot adp \cdot pi}{(1 + atp + adp) \cdot (1 + pi)}$ $adp = \frac{[ADP]}{K_{ADP}} \cdot \exp\left((\gamma_A - 1) \cdot \zeta_A \cdot \left(-\frac{\Delta G_H^{F1}}{RT}\right)\right)$   |
| <p><b>Tous les complexes</b></p> $V_{\max}^+ = k \cdot \exp\left(\gamma_V (\Delta G_{\text{int}}) \cdot \zeta_V \cdot \left(-\frac{\Delta G_{\text{int}}}{RT}\right)\right)$ $V_{\max}^- = k \cdot \exp\left((\gamma_V (\Delta G_{\text{int}}) - 1) \cdot \zeta_V \cdot \left(-\frac{\Delta G_{\text{int}}}{RT}\right)\right)$ |  |

## Résumé du chapitre 4

Le chapitre 4 traite la simulation des OXPHOS à partir d'un système d'équations différentielles. La simulation des OXPHOS nécessite de mettre les nouvelles équations dans le contexte de l'environnement mitochondriale : il faut distinguer entre les différents compartiments – la matrice, la membrane interne, l'espace intermembranaire et le cytosol. Il faut également prendre en compte des réactions qui sont liées aux OXPHOS. Pour cela, nous nous sommes servis comme modèle cadre du modèle d'OXPHOS de Beard [2005], qui contient, à coté des OXPHOS, les réactions suivantes :

- une réaction « dehydrogénase » qui recycle le  $\text{NAD}^+$  en  $\text{NADH}$ , correspondant à une forte simplification du cycle de Krebs (matrice),
- la liaison de magnésium sur les adénosines phosphates (matrice, espace intermembranaire)
- la translocase d'ATP/ADP (membrane interne)
- le symport proton-phosphate (membrane interne)
- la fuite des protons et du potassium (membrane interne)
- l'antiport proton/potassium (membrane interne)
- l'adénylate kinase (espace intermembranaire)
- la diffusion de l'adénosine nucléotides et phosphates à travers la membrane externe.

**Figure 4.** Représentation schématique du modèle OXPHOS. Les composants ont été pris dans le modèle de Beard [2005]. En plus des complexes de la chaîne respiratoire (CI, CIII, CIV) et l'ATP synthase la membrane interne contient aussi le transporteur des adénine nucléotides (ANT) et le transport de phosphate couplé aux protons (PiH) et l'échangeur de  $\text{K}^+/\text{H}^+$  (KH). Egalement considéré sont les fuites des  $\text{H}^+$  et de  $\text{K}^+$  à travers la membrane interne. Le cycle de Krebs situé dans la matrice est représenté par une réaction déshydrogénase (DH) et l'adénylate kinase (AK) et prise en compte dans l'espace intermembranaire. La diffusion des adénine nucléotides et du phosphate à travers la membrane externe est considéré ainsi que l'existence d'ATP et d'ADP à l'état « libre » et « lié au magnésium ». La plupart des composants ont déjà fait partie du modèle de Korzeniewski et Zoladz [2001].





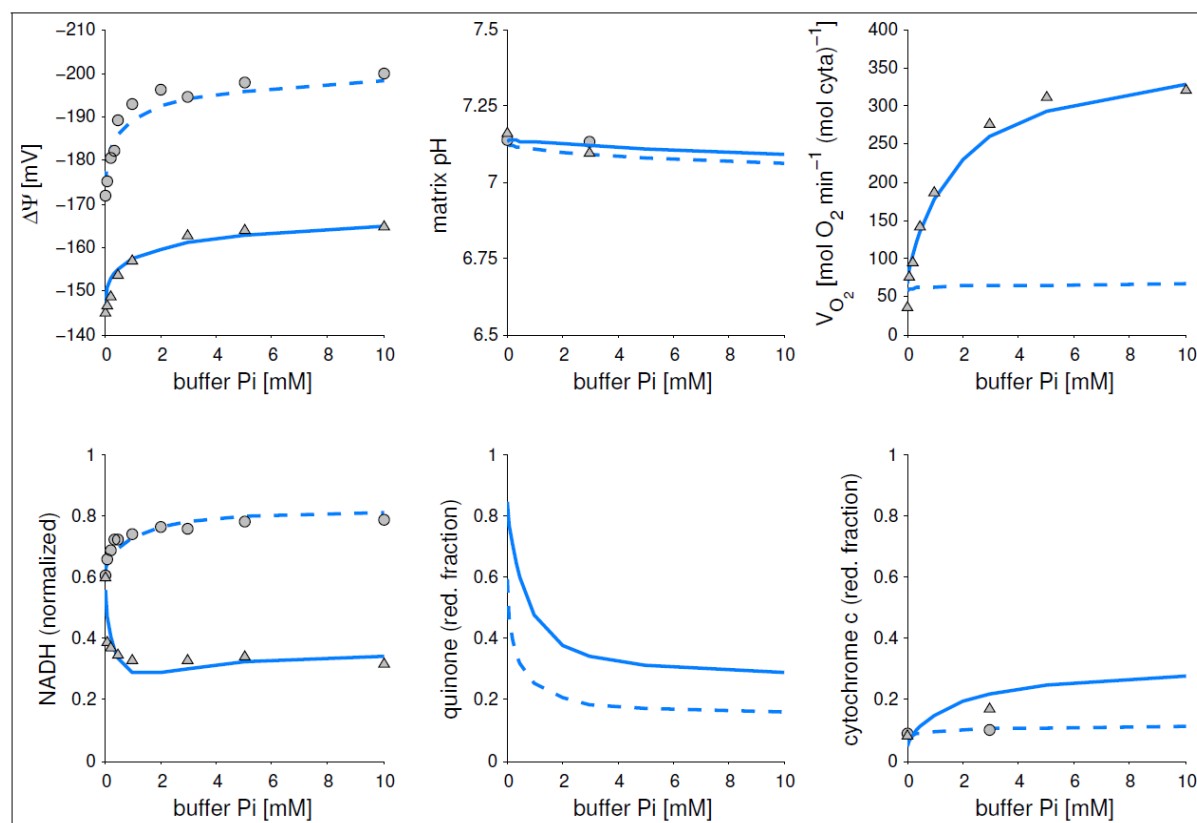
Le complexe II n'est pas inclus dans ce cadre, mais nous l'avons rajouté pour des simulations où le complexe II sert comme point d'entrée des électrons.

La plupart de ces réactions sont modélisées d'une façon simple (loi d'action de masse). Nous avons remplacé les équations des complexes d'OXPHOS avec nos nouvelles expressions. Nous avons aussi fait quelques corrections. Un schéma du modèle est montré dans la figure 4.

Pour l'estimation des valeurs des paramètres, nous nous sommes servis du large ensemble de données expérimentale de Bose et al. [2003] où des propriétés principales de la chaîne respiratoire ont été mesurées à différentes concentrations de phosphate et à l'état phosphorylant et non phosphorylant: le gradient électrique, le pH matriciel, le taux respiratoire et l'état de redox de  $\text{NAD}^+$  et de cytochrome c. Nous avons utilisé un algorithme génétique et, afin de raffiner les résultats, une routine de minimisation d'erreurs locales.

Les données de Bose se laissent bien décrire avec le nouveau modèle d'OXPHOS, comme montré dans la figure 5. Il est important de remarquer que nous avons gardé les valeurs des paramètres  $K_m$  et  $V_{\max}$  des complexes OXPHOS que nous avons obtenus au chapitre 2 ce qui confirme qu'avec ces nouvelles équations il est possible de décrire les OXPHOS en présence du gradient de protons aussi bien qu'en son absence.

**Figure 5 :** Le nouvel modèle d'OXPHOS décrit bien les propriétés principales de la chaîne respiratoire en fonction de la concentration de phosphate dans l'espace intermembranaire. Les lignes continues signifient l'état phosphorylant, les lignes discontinues l'état non phosphorylante (absence d'ADP). Données expérimentales : Bose [2003].



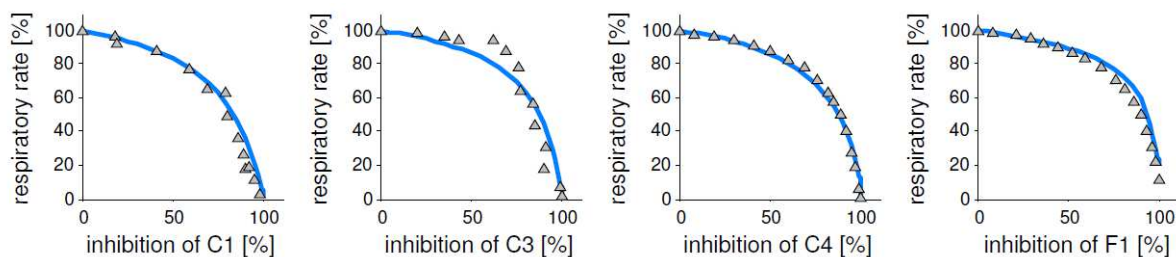
Nous avons aussi simulé le système avec le complexe II comme point d'entrée des électrons. Utilisant pour le reste les mêmes paramètres, nous avons trouvé un taux de respiration légèrement augmenté avec un gradient électrique plus faible à état phosphorylant et un gradient augmenté à l'état non-phosphorylant, bien attendu dû au fait que le complexe II ne pompe pas de protons.

Puis nous avons analysé l'influence des  $K_m$  des quinones oxydées et réduites des complexes I et III. Nous avons trouvé qu'en particulier pour l'état non phosphorylant le modèle est robuste concernant des changements de ces paramètres (pour un même site les valeurs pour quinone et quinol ont été changées avec la même proportion en raison des contraintes thermodynamiques). Ainsi nous avons pu montrer que malgré la possibilité que les  $K_m$  apparents de ces molécules hydrophobes soient bien différents de leurs valeurs propres, cette imprécision ne touchera que peu les résultats des simulations.

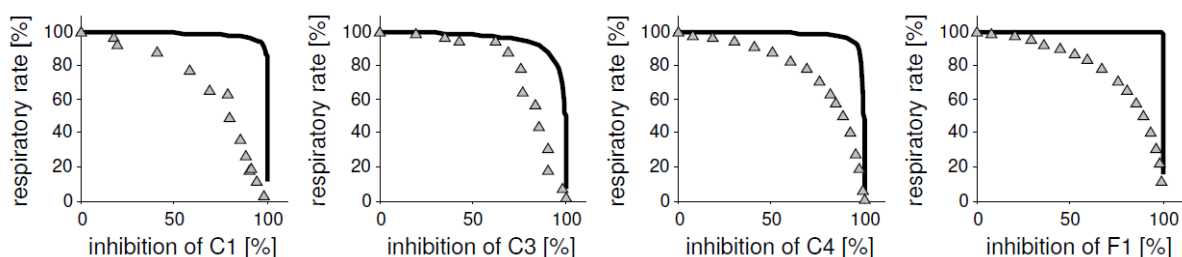
En simulant des expériences de titration avec un inhibiteur d'un des complexes et en regardant les activités des complexes, nous avons trouvé que les courbes d'effet de seuil de Benard et al. [2006] sont bien décrites par notre modèle, avec les mêmes paramètres (voir figure 6). Nous avons montré ainsi que ce modèle est capable de bien reproduire l'effet d'une perturbation locale sur le fonctionnement global du système. Ceci est très important pour analyser des maladies mitochondriales qui sont liées à des déficits des complexes d'OXPPOS. Le modèle originale de Beard [2005] dans lequel les complexes d'OXPPOS étaient modélisés par la loi d'action de masse n'avait pas cette propriété. Avec le développement de notre modèle nous avons donc fait un pas important vers une modélisation plus fidèle des OXPPOS.

**Figure 6:** Taux respiratoire en fonction de l'inhibition des différents complexes de la chaîne respiratoire. a) le nouvel modèle reproduit les courbes expérimentales de Benard et al. [2006] sans aucune modification des paramètres. b) le modèle de Beard [2005] ne peut pas reproduire ces données expérimentales.

**a) nouveau modèle**



**b) modèle de Beard**



Nous avons également simulé les courbes d'effet de seuil avec le complexe II comme point d'entrée des électrons. Ici pour le complexe II, le seuil est moins prononcé comparé avec celui du complexe I, alors que pour la ATP synthase, le seuil est un peu plus prononcé. Pour les deux points d'entrée, jusqu'à presque une inhibition totale d'un complexes respiratoire, le  $\Delta\psi$  et le  $\Delta pH$  ne changent que très peu à l'état stationnaire.

En absence du gradient, le seuil est très prononcé pour tous les complexes, ce qui est dû au fait que sous ces conditions ils ne sont pas limitant. Une exception est le complexe II, dont le fonctionnement n'est pas dépendant du gradient.

Nous avons de plus analysé le rapport du nombre des protons transféré de l'espace intermembranaire dans la matrice par l'ATP synthase lors de la phosphorylation d'un ATP. Ce rapport est probablement fixé ou au moins limité par la structure de l'ATP synthase et peut varier entre différents espèces. Pour l'ATP synthase bovine la structure suggère 8/3 alors que pour la levure le rapport est 10/3. Dans nos simulations nous avons supposé un rapport de 9/3. En augmentant ce rapport, nous avons trouvé en condition phosphorylante une diminution de  $\Delta\psi$  et une augmentation du taux respiratoire. De tels effets sur l'état énergétique de la mitochondrie pourraient refléter une accommodation à l'environnement d'un organisme au cours de l'évolution.

Les simulations précédentes ont considéré l'état stationnaire du système, mais nous avons également observé le système au cours du temps (dynamique).

Nous avons simulé des expériences où la respiration, le  $\Delta\psi$  et l'état redox de NAD ont été suivi au cours du temps, à la suite d'ajout de substrat respiratoire, du phosphate et de l'ADP [Bose et al 2003] et aussi de la KCN [Quarato et al.]. Toutes les données étaient bien reproduit par le modèle à l'exception du  $\Delta\psi$  dans des situations suivantes : en limite de substrat respiratoire, en anoxie et en présence d'un découplant. Une explication pour ce comportement est que seulement quelques types d'ions physiologiques sont considérés dans ce modèle ; en considérer davantage ainsi que des protéines chargées au niveau de la membrane interne pourraient aider à maintenir un gradient de « repos » mis en évidence expérimentalement quand le système est découplé. Ceci montre une limite du modèle qui est importante à connaître pour des simulations sous des conditions extrêmes.

Dans l'annexe nous présentons aussi une approche pour la modélisation des supercomplexes, ici nous nous sommes occupés du supercomplexe I + III. Nous avons testé un modèle avec une canalisation stricte – où le complexe I et III sont rassemblés en un complexe – et un modèle de canalisation partielle - où la taille du pool de quinone entre ces deux complexes est variée. Pour la première approche il existe des conditions où la formation des supercomplexes contribue positivement à l'efficacité du système, mais pour la deuxième approche la formation d'un supercomplexe n'améliore pas la performance. Cependant, nous n'avons pas pris en compte le raccourcissement du chemin de diffusion de quinone entre les deux complexes, ce qui devrait être un aspect important dans l'analyse.

## Conclusion

Nous avons développé un modèle d'OXPHOS basé sur un système d'équations différentielles. L'effort a été mis sur la dérivation des équations pour la description des cinétiques des complexes d'OXPHOS isolés. Ces équations sont valides dans un large intervalle des concentrations des substrats et produits et également du gradient électrochimique des protons. Ces prises en compte constituent un pas important vers une modélisation plus fidèle des OXPHOS.

Nous avons ensuite combiné ces nouvelles équations cinétiques avec le modèle de Beard [2005] comme cadre. Notre modèle permet la description de données extensives de Bose et al. [2003] qui couvrent le  $\Delta\psi$ , le pH matriciel, le taux respiratoire et les états redox de NAD et cytochrome c. Nous avons ainsi montré que nos nouvelles équations fonctionnent bien aussi dans le contexte mitochondriale global.

Le modèle peut de plus reproduire les taux respiratoire en fonction du pourcentage d'inhibition d'un complexe d'OXPHOS [Benard 2006], c'est-à-dire le comportement global du système en fonction des perturbations locale. Cette propriété est très importante pour pouvoir bien simuler des perturbations de ce système.

Il est important de connaître les limites du modèles et nous avons trouvé un point faible qui concerne la simulation des cas extrêmes suivants : anoxie, découplage et absence de substrat respiratoire. Il faut sans doute rajouter certains composants au modèle.

Dans son ensemble le modèle est une très bonne base pour simuler et analyser le rôle des OXPHOS et de la mitochondrie dans le métabolisme énergétique dans les conditions physiologiques et pathologiques suivantes :

- les déficits des complexes d'OXPHOS dans les cas des pathologies mitochondriales
- les effets des différentes substrates respiratoires.
- le rôle des supercomplexes dans la cinétique de la chaîne respiratoire
- le rôle des différents pools de quinones
- la régulation du complexe IV par ADP et ATP.
- La production des dérivés réactifs d'oxygène (ROS) via les complexe I et III, et les conséquences sur les OXPHOS créés par les ROS
- L'efficacité des systèmes d'OXPHOS dépendant de la stœchiométrie protons/ATP.

## Bibliographie

- D. Beard. A Biophysical model of the mitochondrial respiratory system and oxidative phosphorylation. *PLoS Comput Biol*, 1(4):e36, 2005.
- G. Benard, B. Faustin, E. Passerieux, A. Galinier, C. Rocher, N. Bellance, J.-P. Delage, L. Casteilla, T. Letellier, and R. Rossignol. Physiological diversity of mitochondrial oxidative phosphorylation. *Am J Cell Physiol*, 291(6), :C1172-82, 2006.
- S. Bose, S. French, F. J. Evans, F. Joubert, and R. S. Balaban. Metabolic network control of oxidative phosphorylation: multiple roles of inorganic phosphate. *J Biol Chem*, 278(40):39155-65, Oct. 2003.
- B. Korzeniewski and J. A. Zoladz. A model of oxidative phosphorylation in mammalian skeletal muscle. *Biophys Chem*, 92(1-2):17-34, 2001.
- S. Ransac, C. Arnarez, and J.-P. Mazat. The flitting of electrons in complex I: a stochastic approach. *Biochim Biophys Acta*, 1797(6-7):641-8, 2010.
- S. Ransac, M. Heiske, J.-P. Mazat. From in silico to in spectro kinetics of respiratory complex I. *Biochim Biophys Acta*, 1817(10):1958-69, 2012.
- I. H. Segel . Enzyme kinetics behavior and analysis of rapid equilibrium and steady state enzyme systems. John Wiley & Sons, New York, wiley classics library edition, 1993.